

09/744016

Europäisches
PatentamtEuropean
Patent OfficeOffice européen
des brevets

EP 99/05220

REC'D 21 SEP 1999

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

ESKU

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98113876.1

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.c.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

14/09/99



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.: 98113876.1
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 22/07/98
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Universität Ulm
89081 Ulm

GERMANY
Völkel, Helge, Dr.
89081 Ulm

GERMANY
Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Rekombinantes Expressions System und Hoch-Durchsatz BioAssay für die therapeutische Anwendung von Calcineurin-A-Alpha, Calcineurin-A-Beta, Calcineurin-A-Gamma, Calcineurin-B und Copper/Zinc-Superoxide Dismutase bzw. zur Identifizierung von Pharmazeutika

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

C12N15/12, C12N15/53, C12N15/55, C12N15/62, C12N15/70, C12N15/85, C12N9/16, C12N9/02, C07K14/47, G01N33/50, A61K38/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

Weiterer Anmelder:

Selzle, Martin
89081 Ulm
GERMANY

Beschreibung

Prinzip: Biologisches Testsystem (Bioassay) zur Identifizierung von Aktivatoren und Inhibitoren (Modulatoren) der Enzyme Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (CuZnSOD; E.C. 1.15.1.1) und Phosphoproteinphosphatase-2b (Calcineurin, E.C. 3.1.3.16).

Details: Durch den Bioassay wird die Interaktion rekombinant exprimierter humaner CuZnSOD mit humanen Calcineurin Isoformen (A-alpha, A-beta, A-Gamma, B) in Gegenwart von Calcium und Calmodulin quantifiziert. Auf biochemischer Ebene dient das Heterotetramer Calcineurin-A*, Calcineurin-B, Calmodulin, CuZnSOD als Target für Substanzen, die diesen Komplex stabilisieren oder zerstören können. Gemessen wird die Bindungskonstante zwischen Calcineurin-A und CuZnSOD durch Fluoreszenzdetektion. Die CuZnSOD ist dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Meßprinzip ist die Laser-Korrelations-Spektroskopie. Alternativ oder in Kombination mit CuZnSOD kann ein fluorogenes Peptid[™] (RII-Fluophos) als Meßsubstrat benutzt werden. Das beschriebene Meßprinzip kommt dabei grundsätzlich in zwei Testsystemen zur Anwendung:

1. Einem molekularen in vitro Bioassay (proteinchemisch isoliertes Protein-Heterotetramer in Kombination mit dem fluorogenem Peptid RII-FluoPhos)
2. Einem zellulären in vivo Bioassay (mit Calcineurin-A, Calcineurin-B und fluoreszierender CuZnSOD bzw. RII-Fluophos Peptid transfizierte Säugerzellen).

Ziel: Identifizierung von Inhibitoren und Aktivatoren des Signalenzymes Calcineurin. Inhibitoren und Aktivatoren des Calcineurins sind als potentielle Pharmazeutika für die Therapie chronischer und akuter Neurodegeneration, entzündlicher Erkrankungen, Herz-Kreislauf Erkrankungen, zur Immunsuppression bei der Transplantationschirurgie.

Inhibitoren: Als Inhibitoren werden Substanzen definiert,

- a) die im molekularen **oder** zellulären Bioassay die Interaktion von Calcineurin-A mit CuZnSOD vermindern (da die CuZnSOD selber ein physiologischer Aktivator ist)
- b) die im molekularen **oder** zellulären Bioassay die Interaktion mit dem RII-Fluophos Peptid vermindern
- c) die im zellulären Bioassay die Proteinexpression der aktivierenden CuZnSOD auf transkriptionaler, translatorischer und/oder posttranslationaler Ebene vermindern.
- d) die im zellulären Bioassay die Proteinexpression von Calcineurin-A Isoformen oder Calcineurin-B auf transkriptionaler, translatorischer und/oder posttranslationaler Ebene vermindern.

Aktivatoren: Als Aktivatoren werden Substanzen definiert, welche die gegenteiligen Effekte wie unter "Inhibitoren" Punkte a) - d) beschrieben zeigen.

- im zellulären und molekularen Bioassay sollen die Calcineurin Isoformen A-Alpha, A-Beta und A-Gamma getrennt und vergleichend untersucht werden.
- ** siehe Zeichnung, Sequenzen, Formeln

Patentansprüche (35)

Die Patentansprüche umfassen:

1. Prokaryontische DNA Expressionsvektoren für die rekombinante Expression von Calcineurin-A, Calcineurin-B und CuZnSOD (molekularer Assay)
2. Eukaryontische DNA Expressionsvektoren für die Transfektion von Säugerzellen mit Calcineurin-A, Calcineurin-B und CuZnSOD (zellulärer Assay)
3. Reinigungs- und Prozessierungsprotokolle für rekombinante Calcineurin und CuZnSOD Proteine
4. Verwendung des RII-Fluophos-Peptid als Phosphatase Ligand
5. Bioassay auf der Basis der Koexpression von Calcineurin-A, Calcineurin-B und CuZnSOD
6. Therapieanwendung von humaner rekombinanter CuZnSOD
7. Therapieanwendung von Calcineurin Inhibitoren und Aktivatoren
8. Präparative Affinitätschromatographie und Biosensoranwendungen auf der Basis rekombinanter CuZnSOD bzw Calcineurine.

1. Prokaryontische DNA Expressionsvektoren für die rekombinante Expression von Calcineurin-A, Calcineurin-B und CuZnSOD (molekularer Assay)

- 1.1 DNA Vektor CuZnSOD-pQE30
- 1.2. DNA Vektor CuZnSOD-pQE60
- 1.3 DNA Vektor CNAa1-pQE30
- 1.4 DNA Vektor CNAa2-pQE30
- 1.5 DNA Vektor CNAb1-pQE30
- 1.6 DNA Vektor CNAb2-pQE30
- 1.7 DNA Vektor CNAg1-pQE30
- 1.8 DNA Vektor CNAg2-pQE30

2. Eukaryontische DNA Expressionsvektoren für die Transfektion von Säugerzellen mit Calcineurin-A, Calcineurin-B und CuZnSOD (zellulärer Assay)

- 2.1 DNA Vektor CuZnSOD-pEGFP
- 2.2 DNA Vektor CNAa-pEGFP
- 2.3 DNA Vektor CANb-pEGFP
- 2.4 DNA Vektor CNAg-pEGFP

3. Reinigungs- und Prozessierungsprotokolle für rekombinante Calcineurin und CuZnSOD Proteine

- 3.1 Reinigung von Calcineurin A und B mittels einer Histidin-Tag-CuZnSODAffinitätschromatographie (Rekombinante CuZnSOD ist nichtkovalent über einen Histidin-Tag an Kupfer-Zink-Nitrilotriacetat gekoppelt und dient seinerseits als Affinitätsligand für den Calcineurin-A/B Komplex.
- 3.2 Reinigung anderer Kupfer oder/und Zink bindender Proteine mittels Cu/Zn-Nitriloacetat.
- 3.3 Reinigung anderer CuZnSOD Liganden (endogener oder exogener) mittels Histidin-Tagged-CuZnSOD-Protein.
- 3.4 N- und C-terminale Prozessierung von Polyhistidin-getaggter-CuZnSOD bzw. Polyhistidin-tag Calcineurin mit Cathepsin-C bzw. Carboxypeptidase-A.

4. RII-Fluophos-Peptid

- 4.1 Verwendung als Phosphatase Enzymsubstrat oder Ligand für molekularbiologische, biochemische oder zellbiologische Assays.
- 4.2 Verwendung als Peptid-Marker in der Fluoreszenzmikroskopie.
- 4.3 Verwendung von Tyrosinkinasen zur Seitenkettenphosphorylierung von Fluorescein und andern Farbstoffen.

5. Bioassay auf der Basis der Koexpression von Calcineurin-A, Calcineurin-B und CuZnSOD

- 5.1 Verwendung zur Identifikation von Calcineurin-A Liganden.
- 5.2 Verwendung zur Identifikation von Calcineurin-B Liganden.
- 5.3 Verwendung zur Identifikation von CuZnSOD Liganden.
- 5.4 Etablierung von high-Throughput Testsystemen mit Calcineurin auf der Basis von rekombinanter CuZnSOD bzw. RII-Fluophos Peptid.

6. Therapieanwendung von humaner rekombinanter CuZnSOD

Verwendung als topisch, oral, intramuskulär, intravenös, intrathekal oder intracerebroventrikulär appliziertes Therapeutikum zur Behandlung von:

- 6.1 Reperfusionsschäden in der Transplantationschirurgie, Ischämie und Hypoxie des Herzens bzw. Zentralen Nervensystems.
- 6.2 Entzündlichen Erkrankungen, insbesondere des Nervensystems, des Verdauungstraktes, der Blutgefäße und viraler bzw. bakteriologischer Infektionen.
- 6.3 Behandlung akuter und chronischer neurodegenerativer Erkrankungen (Schlaganfall, Epilepsie, Alzheimer, Parkinson, ALS).
- 6.4 Behandlung akuter und chronischer Alterungsprozesse.
- 6.5 Verwendung als Kosmetikum und Regenerationstherapeutikum bei Verbrennungen und anderen offenen Wunden.

7. Therapieanwendung von Calcineurin Inhibitoren und Aktivatoren

- 7.1 Behandlung von akuter und chronischer Neurodegeneration, insbesondere Schlaganfall, Epilepsie, Alzheimer, Parkinson und ALS.
- 7.2 Verwendung als Immunsuppressiva bei entzündlichen Erkrankungen oder in der Transplantationschirurgie.
- 7.3 Verwendung als Herz-/Kreislauftherapeutikum, insbesondere zur Therapie bei Herzinfarkt und Herzhypertrophie.

8. Präparative Affinitätschromatographie und Biosensoranwendungen auf der Basis rekombinanter CuZnSOD bzw Calcineurine

- 8.1 Präparative Isolierung von CuZnSOD Liganden mittels rekombinanter CuZnSOD als Affinitätsligand
- 8.2 Präparative Isolierung von Calcineurin Liganden mittels rekombinanten Calcineurinen als Affinitätsliganden
- 8.3 Verwendung rekombinanter CuZnSOD als Biosensorligand
- 8.4 Verwendung rekombinanter calcineurine auf Biosensorligand

Zusammenfassung

Molekulare und zelluläre Bioassays dienen der Identifizierung von Substanzen, welche die stabilisierende Wechselwirkung zwischen Calcineurin und CuZnSOD stören bzw. welche direkt an der Genregulation beider Enzyme beteiligt sind. Als messbare Targets für die Analyse durch Laser-Korrelations-Spektroskopie dienen fluoreszenzmarkierte CuZnSOD (gekoppelter chemischer Farbstoff oder EGFP Fusionsprotein) bzw. Calcineurin Isoenzyme (EGFP Fusionsprotein) oder ein neu konstruiertes Peptidsubstrat (R11-Fluophos).

Inhibitoren oder Aktivatoren der Calcineurin oder CuZnSOD sind potentielle Pharmazeutika zur Behandlung neurologischer Erkrankungen, Immunerkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Die CuZnSOD selber soll als Therapeutikum zur Behandlung neurologischer Erkrankungen, Immunerkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt werden. Weiterhin wird die Verwendung der CuZnSOD als Kosmetikum, Antialterungs- und Regeneration-Therapeutikum beansprucht.

Die Histidin getaggten CuZnSOD bzw. Calcineurin Fusionproteine sollen darüber hinaus zur Isolierung von CuZnSOD bzw. Calcineurin Liganden verwendet werden.

Zeichnungen/Sequenzen/Protokolle

1. Prokaryontische DNA Expressionsvektoren (siehe beiliegende Sequenzen)

- 1.1. DNA Vektor CuZnSOD-pQE30
- 1.2. DNA Vektor CuZnSOD-pQE60
- 1.3. DNA Vektor CNAa1-pQE30
- 1.4. DNA Vektor CNAa2-pQE30
- 1.5. DNA Vektor CNAb1-pQE30
- 1.6. DNA Vektor CNAb2-pQE30
- 1.7. DNA Vektor CNAg1-pQE30
- 1.8. DNA Vektor CNAg2-pQE30

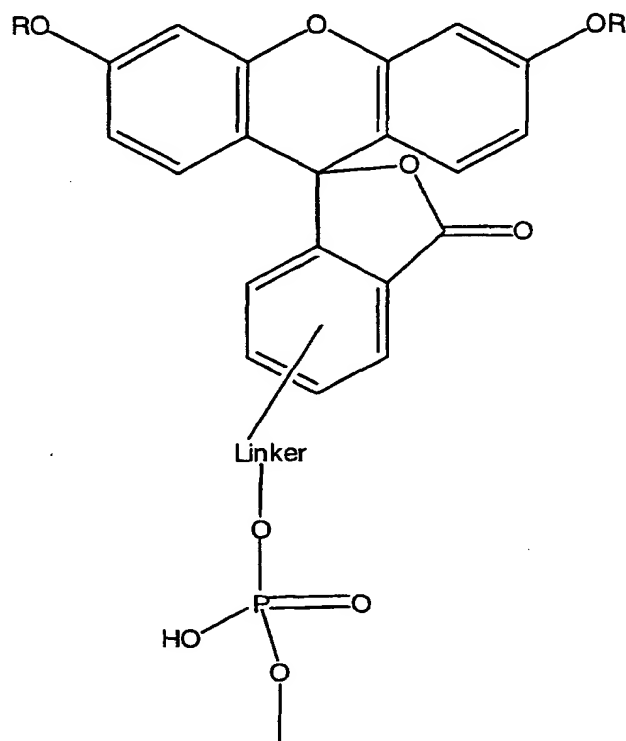
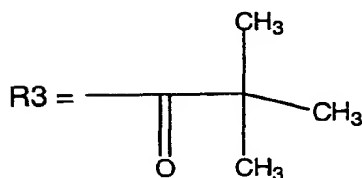
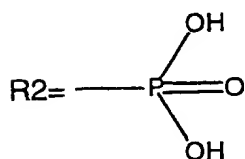
2. Eukaryontische DNA Expressionsvektoren (siehe beiliegende Sequenzen)

- 2.1. DNA Vektor CuZnSOD-pEGFP
- 2.2. DNA Vektor CNAa-pEGFP
- 2.3. DNA Vektor CNAb-pEGFP
- 2.4. DNA Vektor CNAg-pEGFP

3. RII-Fluophos-Peptid

RII-FluoPhos (Alle Variationen aus R1, R2, R3)

R1 = H

-NH₂-Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Ala-Glu-COOH

- Synthese aus Apozeptid mittels Fluorescein-phosphoramiditen (Serin-OH Kopplung an Farbstoffphosphoramidite)
- Enzymatische Phosphorylierung (R2) der Fluoresceinseitenketten mittels ATP und Tyrosinkinase

4. Molekulare Bioassays auf der Basis der Koexpression von Calcineurin-A, Calcineurin-B und CuZnSOD

Calcineurin-A (CNA)

Calcineurin-B (CNB)

Calmodulin (CaM)

Kupfer/Zink-Superoxidedismutase (SOD)

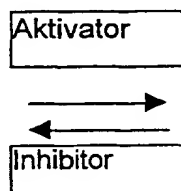
RII-Fluophos Substrat (RII*)

Fluoreszenzfarbstoff (*)

(...) = Komplex

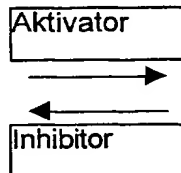
- = Bindung

4.1 CNA + CNB + CaM + SOD*



(CNA-CNB-CaM+SOD*)

4.2 CNA + CNB + CaM + RII*+SOD*



(CNA-CNB-CaM-RII*-SOD*)+Phosphat

5. Zelluläre Bioassays auf der Basis der Expression eines fluoreszierenden Reporterproteins (Calcineurin-A oder CuZnSOD).

5.1 Zelle mit homolog rekombiniertem fluoreszierenden Calcineurin Fusionsgen



↓ mögliche Regulationsebenen von Calcineurin Modulatoren (Transkription, RNA-Prozessing, Translation, postrtranslationale Modifikation)

Aktivator: CNA*-Protein Konzentration steigt

Inhibitor: CNA*-Protein Konzentration fällt

5.2 Zelle mit homolog rekombiniertem fluoreszierenden Calcineurin Fusionsgen



↓ mögliche Regulationsebenen von CuZnSOD Modulatoren (Transkription, RNA-Prozessing, Translation, postrtranslationale Modifikation)

Aktivator: CuZnSOD*-Protein Konzentration steigt (Calcineurin stabilisiert)

Inhibitor: CuZnSOD*-Protein Konzentration fällt (Calcineurin destabilisiert)

6. Präparative Affinitätschromatographie mit rekombinanten His-Tag-CuZnSOD/Calcineurin

NTA = Nitrilotriacetat

NiNTA (bzw. Cu/ZnNTA)-Matrix (Chromatographiematerial, Biosensor, etc.)

His-Tag-CuZnSOD

CuZnSOD Liganden

His-Tag-Calcineurin

Calcineurin Liganden

Liganden = niedermolekulare endogene, exogene und synthetische Stoffe, wechselwirkende Makromoleküle wie Peptide, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren, synthetische Polymere

